

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 21 June 2000 (21.06.00)	Applicant's or agent's file reference F 1704 - sch/msl
International application No. PCT/DE99/03506	Priority date (day/month/year) 03 November 1998 (03.11.98)
International filing date (day/month/year) 03 November 1999 (03.11.99)	Applicant HILDT, Eberhard et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 31 May 2000 (31.05.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 27 FEB 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



151

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts F 1704 - sch/msl	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03506	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 03/11/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/36		
Anmelder HILDT, Eberhard; et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - I ☒ Grundlage des Berichts
 - II ☐ Priorität
 - III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 31/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27.02.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter Macchia, G Tel. Nr. +31 70 340 4078 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-12 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-11 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-5, eingereicht mit Schreiben vom 04/05/2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 10, 11.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 10, 11, in bezug auf gewerbliche Anwendbarkeit, beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-11
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-11
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

- 1). Die Ansprüche 10 und 11, insofern Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers betreffend, beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt.

Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- 1). Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 95 20657 A (GX BIOSYSTEMS A/S (DK); SOKURENKO; HASTY; KLEMM; PALLESEN; MOLIN), 3. August 1995 (1995-08-03)

D2: EP-A-0 456 215 (ABBOTT LABORATORIES (US); MIMMS L.T.; FLOREANI M.F.), 13. November 1991 (1991-11-13)

D3: WIEPRECHT T. ET AL.: 'Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides' BIOCHEMISTRY, Bd.36 1997, Seiten 12869-12880, XP002141072

- 2). Dokument D1 offenbart ein Peptid, das die Aminosäuresequenz " NSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVLTTASPLSSIFSRIGDPALN " aus dem HBV-Oberflächenprotein aufweist (D1: Seite 57). Dieses Peptid umfaßt das Peptid " PLSSIFSRIGDP " von Fig. 1 der vorliegenden Anmeldung. Dokument D1 umfaßt die DNA, die für dieses Peptid kodiert, ein Expressionsplasmid (pLPA38), das die obengenannte DNA umfaßt, Bakterienzellen, die das obengenannte Expressionsplasmid enthalten, ein Verfahren zur Herstellung des obengenannten Peptids und Antikörper gerichtet gegen das obengenannte Peptid (D1: Seiten 57, 62-66, Abbildung 8).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Daher ist der Gegenstand der Ansprüche 1-9 nicht neu (Artikel 33(2) PCT), weil die kennzeichnenden, technischen Merkmale der Ansprüche 1 und 2 keine Unterscheidung des beanspruchten Gegenstandes mit D1 zulassen.

- 3). Dokument D2 offenbart einen monoklonalen Antikörper gerichtet gegen ein Peptid, das die Aminosäuresequenz " TVNPVLTTASPLSSIFSRIGDPALN " aus dem HBV-Oberflächenprotein aufweist (D2: Seite 10; Anspruch 1). Dieses Peptid umfaßt das Peptid " PLSSIFSRIGDP " von Fig. 1 der vorliegenden Anmeldung. Deshalb steht Dokument D2 dem Gegenstand der Ansprüche 1, 2 und 9 der vorliegenden Anmeldung neuheitsschädlich entgegen (Artikel 33(2) PCT).
- 4). Dokument D3 offenbart die Verwendung von dem Peptid 180°M2a zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Calcein (D3: Seite 12871 und 12873-12874). Das Peptid 180°M2a weist die Aminosäuresequenz " GIGKFLHKVGSFIKSWKGEIMNS " auf (D3: Seite 12873). Die enthaltene Sequenz " KVGSIKSWKGE " stimmt mit der Sequenz " XoioXXioXiX " des Anspruchs 1 überein. Der Gegenstand der Ansprüche 1, 10 und 11 ist daher nicht neu (Artikel 33(2) PCT).
- 5). Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 10 und 11 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

- 1). Die Aminosäuren, die im Anspruch 1 den Ausdrücken **X**, **o** und **i** entsprechen, werden nicht genau angegeben.
Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

- 2). In den Beispielen 1-4 der vorliegenden Anmeldung, wird das Peptid " PLSSIFSRIGDP " von Fig. 1 verwendet.
Dieses Peptid stimmt nicht mit der Formel " XoiiioXXioXiX " des Anspruchs 1 überein, weil das Zeichen " X " gemäß Seiten 2 und 3 der vorliegenden Anmeldung nicht der Aminosäure Prolin entspricht.
Diese Ausführungsbeispiele fallen daher nicht unter Anspruch 1.
Dieser Widerspruch zwischen Anspruch 1 und der Beschreibung führt zu Zweifeln bezüglich des Gegenstandes des Schutzbegehrens, weshalb Anspruch 1 nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

- 3). Die Ansprüche 2 und 5 enthalten Bezugnahmen auf die Zeichnung 1.
Gemäß Regel 6.2 a) PCT dürfen Ansprüche nur dann Bezugnahmen enthalten, wenn dies unbedingt erforderlich ist, was hier nicht der Fall ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

copy
09/830981
Translation
S60

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference F 1704 - sch/msl	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/03506	International filing date (day/month/year) 03 November 1999 (03.11.99)	Priority date (day/month/year) 03 November 1998 (03.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/36		
Applicant HILDT, Eberhard		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 31 May 2000 (31.05.00)	Date of completion of this report 27 February 2001 (27.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/03506

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-12, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims. Nos. 1-11, as originally filed.
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings. sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed.
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03506

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX III

1. Insofar as Claims 10 and 11 concern methods for the treatment of the human or animal body by therapy, the Examiner is of the opinion that their subject matter falls under PCT Rule 67.1(iv).

Consequently, no expert opinion is established regarding the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/03506

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. This report makes reference to the following documents:

- D1: WO-A-95/20657 (GX BIOSYSTEMS A/S (DK); SOKURENKO; HASTY; KLEMM; PALLESEN; MOLIN), 3 August 1995 (1995-08-03)
- D2: EP-A-0 456 215 (ABBOTT LABORATORIES (US); MIMMS L.T.; FLOREANI M.F.), 13 November 1991 (1991-11-13)
- D3: WIEPRECHT T. ET AL.: "Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides", BIOCHEMISTRY, Vol. 36, 1997, pages 12869-12880, XP002141072.

2. D1 discloses a peptide with the amino acid sequence "NSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVLTTAS**PLSSIFSRIGDP**AL N" of the HBV surface protein (D1: page 57). That peptide comprises the peptide "PLSSIFSRIGDP" depicted in Fig. 1 of the present application. D1 includes the DNA encoding this peptide, an expression plasmid (pLPA38) comprising the above-mentioned DNA, bacterial cells containing the above-mentioned expression plasmid, a method for producing

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the above-mentioned peptide and antibodies against the above-mentioned peptide (D1: pages 57 and 62-66, as well as Figure 8).

Consequently, the subject matter of Claims 1-9 is not novel (PCT Article 33(2)) because the characterising technical features of Claims 1 and 2 do not allow the claimed subject matter to be distinguished from D1.

3. D2 discloses a monoclonal antibody against a peptide having the amino acid sequence "TVNPVLTITAS**PLSSIFSRIGDP**ALN" of the HBV surface protein (D2: page 10 and Claim 1). That peptide comprises the peptide "PLSSIFSRIGDP" depicted in Fig. 1 of the present application. Consequently, D2 appears to be detrimental to the novelty of the subject matter of Claims 1, 2 and 9 of the present application (PCT Article 33(2)).
4. D3 discloses the use of the peptide 180°M2a for mediating cellular permeability to calcein (D3: pages 12871 and 12873-12874). The peptide 180°M2a comprises the amino acid sequence "GIGKFLH**KVGSFIKSWKGE**IMNS" (D3: page 12873). The sequence "KVGSFIKSWKGE" contained therein matches the sequence "XoioXXioXiX" of Claim 1.

The subject matter of Claims 1, 10 and 11 is therefore not novel (PCT Article 33(2)).

5. There are no uniform criteria in the PCT Contracting States for assessing the industrial applicability of the subjects of Claims 10 and 11 in their present form. Patentability can also depend on the wording

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03506

of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical treatment.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The amino acids that correspond to expressions **X**, **o** and **i** in Claim 1 are not specified.

As a result, the definition of the subject matter of this claim is not clear (PCT Article 6).

2. The peptide "PLSSIFSRIGDP" of Fig. 1 is used in Examples 1-4 of the present application.

This peptide does not match the formula "XoiiioXXioXiX" of Claim 1 because the sign "X" does not correspond to the amino acid proline, according to pages 2 and 3 of the present application.

Consequently, these embodiments do not fall under Claim 1.

This contradiction between Claim 1 and the description raises doubts regarding the subject matter for which protection is sought, and for this reason Claim 1 is not clear (PCT Article 6).

3. Claims 2 and 5 contain references to Figure 1. PCT Rule 6.2(a) stipulates that claims may contain references to the drawings only when this is absolutely necessary, which is not the case here.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) F 1704 - sch/msl

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

HILDT, Eberhard
Institut für Experimentelle Chirurgie
der Technischen Universität München
Ismaninger Str. 22
81675 München
DE

☒ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

SCHMIDT, Stephanie
Institut für Experimentelle Chirurgie
der Technischen Universität München
Ismaninger Str. 22
81675 München
DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:



Anwalt



gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SCHÜBLER, Andrea
Truderinger Str. 246
81825 München

HUBER & SCHÜSSLER
Patentanwälte · Patent Attorneys
Truderinger Straße 246 · 81825 München
Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Telefonnr.:

089 / 42724748

Telefaxnr.:

089 / 42724749

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

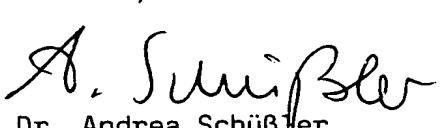
- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) GK

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GN Guinea | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | Indien |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | Grenada |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung:* regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 03 November 1998 (03.11.98)	198 50 718.6	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				
<input checked="" type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) <u>1</u> bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)				
<i>* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.</i>				
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE				
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):		Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):		
ISA/ EPA		Datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Staat (oder regionales Amt)
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE				
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern: Antrag : 3 Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 12 Ansprüche : 2 Zusammenfassung : 1 Zeichnungen : 6 Sequenzprotokollteil der Beschreibung : Blattzahl insgesamt : 24		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei: 1. <input type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung 2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift 5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: 6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache: 7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material 8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form 9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):		
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):		Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: <u>deutsch</u>		
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS				
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.				
München, den 03. November 1999 (vorab per Telefax: 24 Seiten)				
 Dr. Andrea Schüßler				

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): <u>ISA /</u>	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An
HUBER & SCHÜSSLER
z.H. Schüssler, Andrea
Truderinger Str. 246
D-81825 München

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

EINGEGANGEN

24. JULI 2000

Erled.

20.09.00

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

20/07/2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

F 1704 - sch/msl

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/ 03506

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

03/11/1999

Anmelder

HILDT, Eberhard; et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2a) übermittelt wird.
3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß
- ☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.
- ☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis 30^{bis} vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, T.x. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Andria Overbeeke-Siepkas

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts F 1704 - sch/msl	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/ 03506	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1998
Anmelder HILDT, Eberhard; et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/36 C07K14/02 C12N15/62 C07K19/00 C07K16/08 C12N15/87		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) STRAND		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HILDT E. ET AL.: "Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcripational activator and identification of a minimal MHBst activator" ONCOGENE, Bd. 11, Nr. 10, 16. November 1995 (1995-11-16), Seiten 2055-2066, XP000922823 Seite 2059, linke Spalte; Abbildung 4 Seite 2061, rechte Spalte; Abbildung 7 Seite 2063, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 2065, linke Spalte, Absatz 1 --- -/--	2-9
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie	
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 10. Juli 2000	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 20/07/2000	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Macchia, G	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 95 20657 A (GX BIOSYSTEMS A/S (DK); SOKURENKO; HASTY; KLEMM; PALLESEN; MOLIN) 3. August 1995 (1995-08-03) Zusammenfassung Seite 57 Seite 62 -Seite 66 Abbildung 8</p> <p>---</p>	1-9
X	<p>EP 0 456 215 A (ABBOTT LABORATORIES (US); MIMMS L.T.; FLOREANI M.F.) 13. November 1991 (1991-11-13) Zusammenfassung Seite 22; Anspruch 1</p> <p>---</p>	1,2,9
X	<p>WIEPRECHT T. ET AL.: "Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides" BIOCHEMISTRY, Bd. 36, 1997, Seiten 12869-12880, XP002141072 Zusammenfassung Seite 12873, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 12874, linke Spalte, Absatz 3; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1,10,11
T	<p>OESS S. UND HILDT E. : "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens" GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 9, Mai 2000 (2000-05), Seiten 750-758, XP000922825</p> <p>-----</p>	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 10, 11, insofern in vivo Verfahren betreffend, sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03506

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9520657	A	03-08-1995	AU	1532795 A	15-08-1995
			CA	2180726 A	03-08-1995
			EP	0738325 A	23-10-1996

EP 0456215	A	13-11-1991	AU	646039 B	03-02-1994
			AU	7648191 A	14-11-1991
			CA	2041772 A	12-11-1991
			JP	4228087 A	18-08-1992

THIS PAGE BLANK (USPTO)

IPEA/_____

100-8769 DIC-2

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts F 1704 - sch/msl
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03506	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03 Nov 1999 (03.11.99)	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 03 Nov 1998 (03.11.98)

Bezeichnung der Erfindung
Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)</i> HILDT, Eberhard Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München Ismaninger Straße 22 D-81675 München	Telefonnr.:
	Telefaxnr.:
	Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):	DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	DE
------------------------------	----	-----------------------------	----

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SCHMIDT, Stephanie
Institut für Experimentelle Chirurgie der
Technischen Universität München
Ismaninger Straße 22
D-81675 München

Staatsangehörigkeit (Staat):	DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	DE
------------------------------	----	-----------------------------	----

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
------------------------------	-----------------------------

☐ Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
und ☒ ist vom (von den) Anmeldert(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
☐ wird hiermit bestellt: eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

SCHÜBLER, Andrea
Truderinger Str. 246
81825 München

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibernr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und stattdessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

- i) ☒ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
 - ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
 - ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
 - ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
 berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind) ausgenommen

(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- | | |
|---|-----------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34 | |
| Beschreibung | : Blätter |
| Ansprüche | : Blätter |
| Zeichnungen | : Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34 | : Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 | : Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln auflühren): | : Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>


Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht | 5. <input checked="" type="checkbox"/> sonstige (einzeln auflühren): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | V-Scheck Nr. 5741 |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, den 31. Mai 2000


Dr. Andrea Schübler

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

- | | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS: | |
| 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b): | |
| 3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum: Punkt 4 und Punkt 5. unten, finden keine Anwendung. | <input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet |
| 4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 30.5. | |
| 5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 32 ENTSCHULDIGT. | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/36, C07K 14/02, C12N 15/62, C07K 19/00, 16/08, C12N 15/87	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/26379 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 2000 (11.05.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03506 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1999 (03.11.99) (30) Prioritätsdaten: 198 50 718.6 3. November 1998 (03.11.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HILDT, Eberhard [DE/DE]; Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, Ismaninger Strasse 22, D-81675 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMIDT, Stephanie [DE/DE]; Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, Ismaninger Strasse 22, D-81675 München (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: POLYPEPTIDE MEDIATING CELL PERMEABILITY (54) Bezeichnung: ZELLPERMEABILITÄT-VERMITTELNDES POLYPEPTID (57) Abstract The present invention relates to a cell-permeable polypeptide that can mediate cell permeability to substances, DNA coding for said polypeptide and a method for the production of said polypeptide. The invention also relates to antibodies directed against said polypeptide and the use of said polypeptide in the mediation of cell permeability to substances. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid, das zellpermeabel ist und Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, eine für ein solches Polypeptid kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sowie die Verwendung des Polypeptids zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid, das zellpermeabel ist und Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, eine für ein solches Polypeptid kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids.
5 Ferner betrifft die Erfindung gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sowie die Verwendung des Polypeptids zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.

Mit Zellpermeabilität wird die Eigenschaft von Substanzen bezeichnet, in Zellen einzudringen. Diese Eigenschaft findet sich allerdings nur bei wenigen Substanzen. Die meisten Substanzen benötigen Hilfsmittel bzw. Verfahren, um in Zellen einzudringen. Beispiele hierfür sind Mikroinjektion, Elektroporation, Assoziation mit kationischen Lipiden, Liposomenbildung, Rezeptor-vermittelte Endocytose und Virusinfektion. Diese Hilfsmittel bzw. Verfahren weisen jedoch große Nachteile auf.
10 Insbesondere sind sie teuer, erfordern komplexe Versuchsanordnungen und sind nur begrenzt einsetzbar. Ferner ist ihre Effizienz gering und sie erweisen sich oft als toxisch.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde ein Mittel bereitzustellen, mit dem Substanzen in Zellen eingebracht werden können, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.
20

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.
25

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß ein Polypeptid, das vorzugsweise die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt, in Zellen eindringen kann, d.h. Zellpermeabilität aufweist. Er hat ein solches Polypeptid in der PreS2-Region eines Hepatitis B Virus (HBV)-Oberflächenproteins gefunden. Das Polypeptid wird nachstehend mit ZPP "Zellpermeabilität-ver-
30

mittelndes Polypeptid" bezeichnet. ZPP weist die Struktur einer amphiphilen α -Helix auf. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß ZPP die Eigenschaft hat, Zellpermeabilität an Substanzen zu vermitteln. Diese können dann in Zellen eindringen, wobei die Zellpermeabilität der Substanzen nicht auf bestimmte Zellen beschränkt ist.

5 Auch behalten die Substanzen ihre Aktivitäten bei (vgl. Fig. 2). Varianten des erfindungsgemäßen ZPP aus verschiedenen HBV-Subtypen, die sich von der Sequenz von Fig. 1 durch eine oder mehrere Aminosäuren unterscheiden, sind in Fig. 3 gezeigt. Der Aminosäure-Sequenz von Fig. 1 (= PreS2-TLM) entspricht beispielsweise der Subtyp ayw (1) auf der Aminosäureebene vollständig, während

10 die anderen Subtypen demgegenüber einen oder mehrere Austausche aufweisen. Man sieht aber, daß zwischen verschiedenen HBV-Subtypen eine Konservierung bestimmter Aminosäuren vorhanden ist. Diese läßt sich insbesondere durch die graphische Darstellung der Hydrophobizitätswerte bestätigen. Hieraus kann man den Schluß ziehen, daß selbst bei einem Austausch von einer oder mehreren

15 Aminosäuren, die Hydropathie-Verteilung im Gesamtmolekül erhalten bleiben sollte. Aufgrund dieses Befunds ist es für den Fachmann leicht möglich, Varianten der Sequenz von Fig. 1 zu bestimmen, da nicht die Sequenz als solche entscheidend ist, sondern das Hydropathieprofil im Gesamtmolekül. Entsprechendes gilt für verschiedene aviane Hepadnaviren (vgl. Fig. 4) bzw. Hepadnaviren der Nagetiere

20 (vgl. Fig. 5). Diese werden jeweils mit einem erfindungsgemäßen ZPP gemäß Fig. 1 (= PreS2-TLM) verglichen und Hydropathie-Profile aufgestellt. Aus diesen ist ersichtlich, daß selbst bei einem fast vollständigen Austausch der Aminosäuren (z.B. HHBV \leftrightarrow PreS2-TLM) das Hydropathie-Profil im wesentlichen erhalten bleibt. Dies bedeutet, daß nicht die Sequenz an sich, sondern die Abfolge hydro-

25 philer und hydrophober Aminosäuren in einem α -helikalen Motiv entscheidend ist. In einem 12 Aminosäuren umfassenden Peptid sind vorzugsweise die Positionen 2, 5 und 9 von hydrophoben Aminosäuren und die Positionen 3, 4, 8 und 11 von hydrophilen Aminosäuren besetzt. Zu den hydrophoben Aminosäuren zählen Valin, Leucin, Isoleucin, Tryptophan, Phenylalanin und Methionin. Zu den hydrophi-

30 len Aminosäuren zählen Glycin, Serin, Tyrosin, Threonin, Cystein, Asparagin und Glutamin. So gehorcht ein erfindungsgemäßes ZPP der folgenden allgemeinen Formel:

X o i i o X X i o X i X

mit X = Variable Aminosäure (hydrophil, hydrophob oder mit geladenen Seitengruppen)

o = hydrophobe Aminosäure

i = hydrophile Aminosäure

Aminosäuren mit geladenen Seitengruppen sind Aspartat, Glutamat (besitzen beide neg. geladene Seitengruppen), Lysin, Asparagin, Glutamin, Arginin und Histidin (besitzen pos. geladene Seitengruppen).

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Polypeptid (ZPP) bereitzustellen, das Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, wobei ZPP die oben angegebene Sequenz bzw. vorzugsweise die Sequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt und kein natives HBV-Oberflächenprotein ist und die DNA der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert.

Der Ausdruck "Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen" weist darauf hin, daß ZPP Zellpermeabilität an Substanzen jeglicher Art und Abstammung vermitteln kann. Die Substanzen können z.B. Polypeptide (Proteine), Nukleinsäuren oder chemische Verbindungen sein. Beispiele von Polypeptiden sind Struktur-Polypeptide, Tumornekrosefaktor, Interferone, Interleukine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren, Plasmaproteine, z.B. Gerinnungsfaktoren und Stoffwechselenzyme, und Rezeptoren. Insbesondere können die Polypeptide solche sein, welche die Immunogenität von Zellen steigern können. Dies können Polypeptide sein, die Tumorzellen fehlen, z.B. Zytokine, wie IL-2, und GM-CSF, und kostimulatorische Moleküle, wie B7-1, tumorassoziierte Antigene, z.B. MAGE1, Tyrosinasen und virale Polypeptide, z.B. E7 von humanem Papillomvirus und EBNA-3-Polypeptid von Epstein-Barr-Virus. Ferner können die Polypeptide Adapter-Polypeptide, Oligomerisierungsmotive eines Polypeptids, Polypeptidfragmente von Virus-Hüllpolypeptiden, Hormone und Ribozyme sein. Beispiele von Nukleinsäuren sind solche, die für vorstehende

Polypeptide kodieren. Ferner können es Antisense-Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren und Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren sein. Beispiele von chemischen Verbindungen sind Arzneimittel, die keine Polypeptid-Struktur aufweisen. Solche können Cytostatika, Anästhetika, Antihistaminika, Antibiotika und Antimycotika sein. Zur Vermittlung der Zellpermeabilität kann es ausreichend sein, wenn ZPP zusammen mit einer Substanz inkubiert wird, so daß sich chemische Bindungen, z.B. kovalente bzw. nicht-kovalente Bindungen, ausbilden können. Günstig ist es, wenn ZPP über einen Linker mit der Substanz verbunden ist, wobei dies z.B. über Biotin/Streptavidin erfolgen kann. Der Linker kann am N- oder C-Terminus von ZPP vorliegen. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Substanz als Polypeptid zusammen mit ZPP in einem Fusionspolypeptid vorliegt. ZPP kann hierbei am N- oder C-Terminus bzw. innerhalb der Polypeptid-Struktur der Substanz vorliegen. Der Ausdruck "ZPP" umfaßt daher auch ein Fusionspolypeptid, in dem ZPP zusammen mit einer Substanz vorliegt. Die Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen kann durch übliche Verfahren nachgewiesen werden. Günstig ist es, Zellen mit ZPP verbundenen Substanzen zu inkubieren und das Eindringen bzw. Vorliegen von ZPP und/oder den Substanzen in den Zellen nachzuweisen. Dies kann z.B. durch spezifische Antikörper oder Reagentien erfolgen, die direkt oder indirekt mit ZPP bzw. den Substanzen reagieren.

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" umfaßt jegliche ein ZPP darstellende Aminosäuresequenz, die nicht ein natives HBV-Oberflächenprotein ist. Vorzugsweise hybridisiert eine Sequenz, die für "eine durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" codiert, mit der DNA-Sequenz von Fig. 1. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der Sequenz, hin.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ZPP kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist

eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein ZPP kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen entsprechend verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in einem Vektor vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4, pCDNA3, pKSV10, pRCMV und pRK5 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21, SG 13009 und M15pRep4, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Hep62, CCL13 und 293, die Insekten-

zellen Sf9 und Sf21 und die Pflanzenzellen *Lupinus albus*.

Der Fachmann kennt Verfahren und Bedingungen, Zellen mit einem, die erfindungsgemäße DNA enthaltenden Expressionsvektor zu transformieren bzw. trans-
5 fizieren und die Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte ZPP zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ZPP gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden.
10 Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit ZPP zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können ebenfalls mit ZPP erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper
15 werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- 20 (a) ein erfindungsgemäßes Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid (ZPP),
(b) eine erfindungsgemäße DNA,
(c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
(d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

25 Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es Zellpermeabilität zu vermitteln. Mit einem
30 erfindungsgemäßen ZPP kann Zellpermeabilität an Substanzen jeglicher Art und Abstammung vermittelt werden. Die Zellpermeabilität ist universell, d.h. sie ist nicht auf bestimmte Zellen beschränkt. Auch können die Zellen ex vivo bzw. in vivo

vorliegen. Desweiteren löst die Zellpermeabilität keine toxischen Effekte aus.

Die vorliegende Erfindung eignet sich somit bestens für Diagnose und Therapie. Letzteres umfaßt das Eingreifen in die Expression von Genen und in Stoffwechselprozesse. Besonders eignet sich die vorliegende Erfindung für die Diagnose und Therapie schwerster Erkrankungen, z.B. von Tumoren. Ganz besonders zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie sowohl für konservative als auch gentherapeutische Behandlungsmaßnahmen eingesetzt werden kann.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßen, Zellpermeabilität-vermittelnden Polypeptids (ZPP).

Fig. 2 zeigt den Nachweis von durch ZPP vermittelter Zellpermeabilität. Die Spuren 2 und 3 zeigen die Aktivierung von c-Raf1-Kinase. Die Spuren 4 und 5 zeigen deren Hemmung. Die Spuren 6 und 7 zeigen, daß mutiertes ZPP-PLAP (ZPP-KLAP) keine Hemmwirkung aufweist.

Fig. 3 zeigt die Konservierung der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen HBV-Subtypen sowie Hydropathieprofil

Fig. 4 zeigt amphiphile Motive in der PreS-Region verschiedener avianer Hepadnaviren

Fig. 5 zeigt amphiphile Motive in der PreS2-Region verschiedener Hepadnaviren der Nagetiere

Fig. 6 zeigt, daß DHBV42-53-EGFP ein zellpermeables Protein ist

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Nachweis von durch ein erfindungsgemäßes Polypeptid (ZPP) vermittelter Zellpermeabilität.

Der Nachweis einer durch ZPP-vermittelten Zellpermeabilität wird durch Hemmung
5 der TNF α -abhängigen Aktivierung von c-Raf1-Kinase gezeigt. Die Aktivierung der c-Raf1-Kinase beruht auf der Interaktion des TNF-Rezeptors I (TNF-RI) mit dem Adaptermolekül Grb2. Hierzu interagiert die SH3-Domäne von Grb2 mit einem PLAP-Motiv aus der cytoplasmatischen Domäne von TNF-RI.

10 Es wird ZPP in Form eines Fusionspolypeptids bereitgestellt. In diesem mit ZPP-PLAP bezeichneten Fusionspolypeptid liegt ZPP der Aminosäuresequenz von Fig. 1 als N-Terminuspartner und ein PLAP-Motiv aus der cytoplasmatischen Domäne von TNF-RI als C-Terminuspartner vor. Ferner wird ein mit ZPP-KLAP bezeichnetes Fusionspolypeptid bereitgestellt, bei dem das PLAP-Motiv mutiert ist.

15 HeLa Zellen werden 2 h mit 2 μ M ZPP-PLAP bzw. ZPP-KLAP (Kontrolle) inkubiert und 15 min mit 100 μ /ml TNF α stimuliert. Die Aktivierung von c-Raf1 Kinase wird durch einen Immunkomplex-Test unter Verwendung von MEK (Santa Cruz, Biotech) und γ ³²P-ATP als Substrat bestimmt (vgl. Fig. 2).

20 Es zeigt sich, daß ZPP-PLAP in die Zellen gelangt und die Aktivierung von C-Raf1-Kinase vollständig hemmt (vgl. Fig. 2, Spuren 4 und 5). Ferner zeigt sich, daß ZPP-KLAP keine Hemmung erreicht (vgl. Fig. 2, Spuren 6 und 7).

25 **Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Zellpermeabilität-vermittelnden Polypeptids (ZPP).**

30 Die DNA von Fig. 1 wird am 5'-Ende mit einem BglII-Linker und am 3'-Ende mit einem BamHI-Linker versehen und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgespalten. Das erhaltene BglII/BamHI-Fragment wird in den BamHI-gespaltenen Expressionsvektor pQe8 inseriert, so daß das Expressionsplasmid

pQe8/ZPP erhalten wird.

Ferner wird aus dem Expressionsplasmid pGex-1 die eine für GST (Glutathion-S-Transferase) kodierende Sequenz isoliert. Diese weist an ihrem 5'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle gefolgt von einer für eine Thrombinschnittstelle kodierenden Sequenz auf. Ferner weist die Sequenz an ihrem 3'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle auf. Die Sequenz wird in das BamHI-gespaltene Expressionsplasmid pQe8/ZPP inseriert, wodurch das Expressionsplasmid pQe8/ZPP-GST erhalten wird. Dieses kodiert für das Fusionspolypeptid ZPP-GST, pQe48/ZPP-GST wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesmann, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach Induktion wird mittels Ultraschall die Lyse der sedimentierten und gewaschenen Bakterien durchgeführt. Die Isolierung des ZPP-GST-Fusionspolypeptids erfolgt mittels Affinitätschromatographie an einer Glutathion-Säule. Das gebundene ZPP-GST-Fusionspolypeptid wird mittels eines linearen Anstiegs der Glutathion-Konzentration von 0 auf 10 mM eluiert. Das eluierte ZPP-GST Fusionsprotein wird einer Thrombinspaltung unterzogen. Das dadurch freigesetzte Hexa-His-ZPP (Fusionspolypeptid) wird anschließend durch Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen mittels einer Ni-NTA-Agarose isoliert. Dies erfolgt in Gegenwart von 6 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen). Das gebundene Hexa-His-ZPP wird in einem Puffer mit pH 6,3 eluiert, der 250 mM Imidazol enthält. Das Hexa-His-ZPP wird einer 18 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)polypeptid in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 3: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid von Beispiel 2 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 3 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionspolypeptid werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0:	1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14:	2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28:	3. Immunisierung (icFA)
Tag 56:	4. Immunisierung (icFA)
Tag 80:	Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid von Beispiel 2 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen

mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung ($36\mu\text{M}$ 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, $400\mu\text{M}$ Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl_2) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

5

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

10

Pro Immunisierung werden $40\mu\text{g}$ Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in $0,8\text{ml}$ PBS und $0,8\text{ml}$ komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

15

- | | |
|---------|---|
| Tag 0: | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans) |
| Tag 28: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 50: | 3. Immunisierung (icFA) |

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

20

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden $12\mu\text{g}$ Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in $0,25\text{ml}$ PBS und $0,25\text{ml}$ komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der

25

4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in $0,5\text{ml}$ (ohne Adjuvans) gelöst.

30

- | | |
|---------|---|
| Tag 0: | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans) |
| Tag 28: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 56: | 3. Immunisierung (icFA) |
| Tag 84: | 4. Immunisierung (PBS) |
| Tag 87: | Fusion |

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Beispiel 4: Nachweis der DHBV-ZPP vermittelten Zellpermeabilität

5 Nachweis der durch das DHBV(Duck Hepatitis B-Virus)-ZPP vermittelten Zellpermeabilität wurde folgendermaßen geführt. Es wurde gemäß Standardmethoden ein Fusionsprotein bestehend aus einem hexa-His-Tag (6H), dem DHBV-ZPP und
10 eGFP (enhanced green fluorescent protein) analog Beispiel 1 in einem E. coli Expressionssystem hergestellt. Es wurde das pQE-Vektorsystem der Fa. Qiagen angewendet. Dieses Protein (DHBV42-53eGFP) wurde isoliert. Für Kontrollexperimente wurde wt6HeGFP (Fusionsprotein aus 6 His und eGFP) verwendet. Es wurden nun 293-Zellen für 10 und 20 Min. in Gegenwart dieser Proteine inkubiert. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 1 μ M dem Medium zugesetzt. Nach
15 10 bzw. 20 Min. wurden die Zellen lysiert und die cytosolische Fraktion der Zellen durch Ultrazentrifugation isoliert.

Der Nachweis des Vorhandenseins von DHBV42-53-eGFP in der Cytosolfraktion erfolgte mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines hexa-His-tag spezi-
20 fischen Antikörpers (Fig. 6, Spuren 1-4) (anti-Hexa-His6 der Fa. Qiagen) bzw. eines eGFP-spezifischen Antikörpers (anti-eGFP der Fa. Clontech) (Fig. 6, Spuren 5-8). Zur Detektion wurde ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (anti-Maus HRP, anti-Rabbit-HRP der Fa. Amersham) verwendet.

25 Der Western Blot zeigt, daß im Falle der Zugabe von DHBV42-53-eGFP eine Internalisation des Proteins in die Zelle (Cytosol) nach 10 Min. (Spuren 2, 6) bzw. 20 Min. (Spuren 4, 8) zu beobachten ist, während im Falle des Kontrollproteins wt6HeGFP, dem die Zellpermeabilität vermittelnde Sequenz fehlt, dies weder nach 10 Min. (Spuren 1, 5) noch nach 20 Minuten (Spuren 3, 7) zu beobachten ist.

30 Diese Ergebnisse zeigen, daß DHBV-ZPP in der Lage ist als Carrier für andere Proteine zu wirken.

Patentansprüche

1. Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid (ZPP), wobei ZPP die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

X o i i o X X i o X i X

mit

X = Variable Aminosäure (hydrophil, hydrophob oder mit geladenen Seitengruppen)
o = hydrophobe Aminosäure
i = hydrophile Aminosäure

wobei ZPP kein natives HBV-Oberflächenprotein ist.

2. Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid (ZPP) nach Anspruch 1, wobei ZPP die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt und kein natives HBV-Oberflächenprotein ist und wobei die DNA-Sequenz der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert.

3. Nukleinsäure, kodierend für ZPP nach Anspruch 1 oder 2.

4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, wobei die Nukleinsäure eine DNA ist.

5. DNA nach Anspruch 4, umfassend:

- (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert, oder
(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code

verwandte DNA.

6. Expressionsplasmid, umfassend die Nukleinsäure nach Anspruch 3, 4 oder 5.
7. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 6.
8. Verfahren zur Herstellung von ZPP, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 7 unter geeigneten Bedingungen.
9. Antikörper, gerichtet gegen ZPP nach Anspruch 1 oder 2.
10. Verwendung von ZPP nach Anspruch 1 oder 2 zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Substanzen Polypeptide, Nukleinsäuren und chemische Verbindungen umfassen.

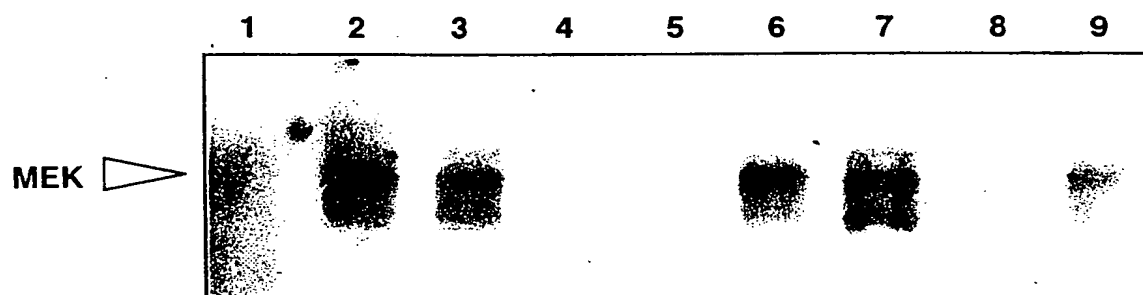
P	L	S	S	I	F	S	R	I	G	D	P
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT

Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/6

Fig. 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 3

3/6

Tabelle 1: Konservierung des PreS2-TLM zwischen verschiedenen HBV-Subtypen

Nukleotidsequenzen, Aminosäuresequenzen und Hydropathie-Werte der Aminosäureseitenketten (nach Kyte & Doolittle, 1982) des PreS2-TLM aus Subtyp ayw (1) im Vergleich zu sechs anderen HBV Subtypen ayw (2), adr (1), adr (2), ayr, adw und adw2. Die mit der Sequenz des PreS2-TLM aus Subtyp ayw (1) identischen Aminosäuren und die dazugehörigen Hydropathie-Werte sind fett dargestellt.

Subtyp ayw (1)

CCC	TTA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT
Pro	Leu	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Ile	Gly	Asp	Pro
-1.6	3.8	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	4.5	-0.4	-3.5	-1.6

Subtyp ayw (2)

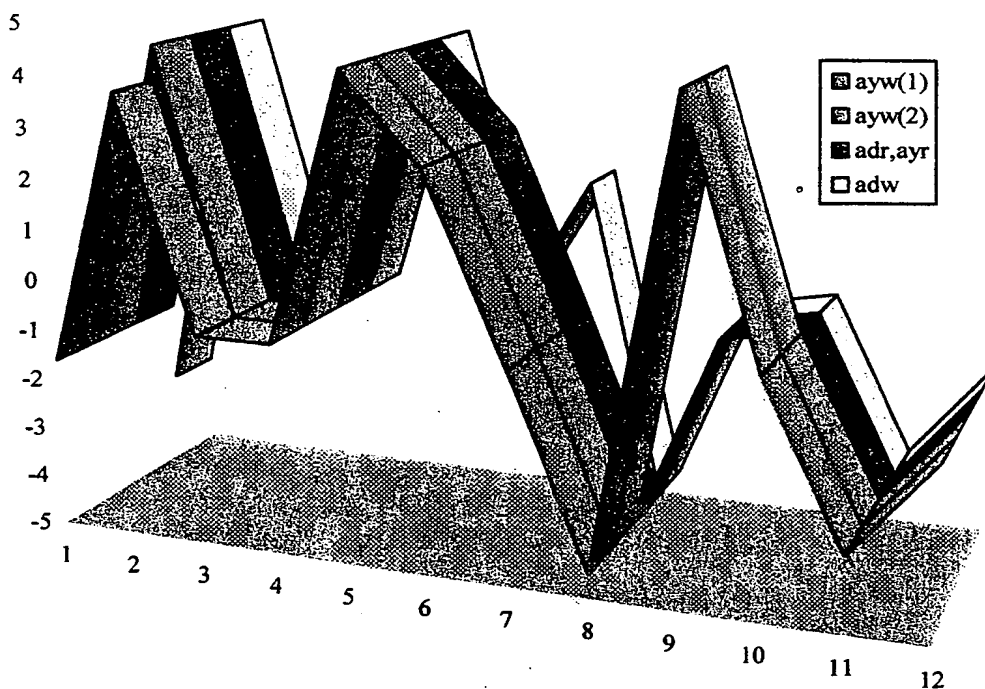
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT
Pro	Ile	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Ile	Gly	Asp	Pro
-1.6	4.5	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	4.5	-0.4	-3.5	-1.6

Subtypen adr (1), adr (2), ayr

CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ACT	GGG	GAC	CCT
Pro	Ile	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro
-1.6	4.5	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	-0.7	-0.4	-3.5	-1.6

Subtypen adw, adw2

CAC	ATC	TCG	TCA	ATC	TCC	GCG	AGG	ACT	GGG	GAC	CCT
His	Ile	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro
-3.2	4.5	-0.8	-0.8	4.5	-0.8	1.8	-4.5	-0.7	-0.4	-3.5	-1.6

**Amphiphilie von PreS2-TLM in verschiedenen HBV-Subtypen**

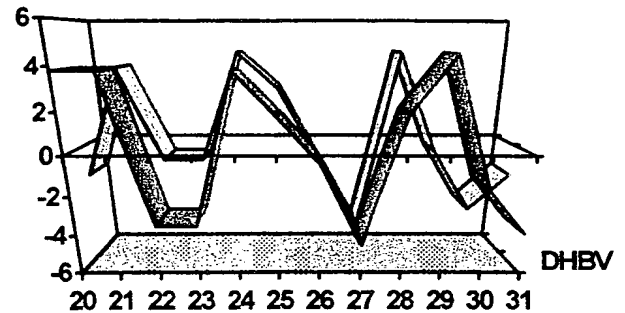
Darstellung der Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren im PreS2-TLM in Subtyp ayw (1) (blau) und den anderen HBV Subtypen ayw (2) (grün), adr (1), adr (2) ayr (rot) sowie adw und adw2 (grau). Auf der y-Achse sind die Hydropathie-Werte der Aminosäureseitenketten (nach Kyte & Doolittle, 1982) aufgetragen, positive Werte entsprechen hydrophoben, negative Werte hydrophilen Aminosäureseitenketten. Auf der x-Achse sind die 12 Aminosäuren des PreS2-TLM und der entsprechenden Sequenzen sechs anderer Subtypen aufgetragen mit dem N-terminalen Prolin an Position 1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

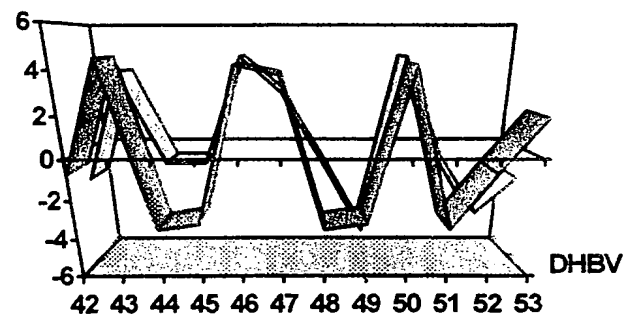
Fig. 4

4/6

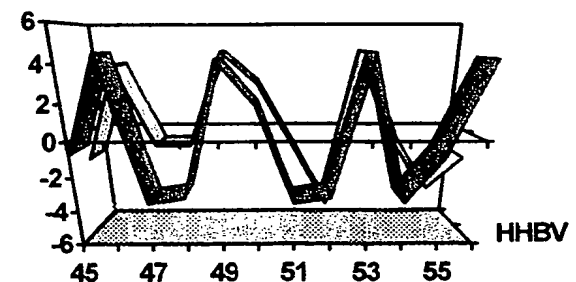
n	DHBV	PreS2-TLM	DHBV	PreS2-TLM
20	L (Leu)	P (Pro)	3,8	-1,6
21	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
22	N (Asn)	S (Ser)	-3,5	-0,8
23	Q (Gln)	S (Ser)	-3,5	-0,8
24	L (Leu)	I (Ile)	3,8	4,5
25	A (Ala)	F (Phe)	1,8	2,8
26	G (Gly)	S (Ser)	-0,4	-0,8
27	R (Arg)	R (Arg)	-4,5	-4,5
28	M (Met)	I (Ile)	1,9	4,5
29	I (Ile)	G (Gly)	4,5	-0,4
30	P (Pro)	D (Asp)	-1,6	-3,5
31	K (Lys)	P (Pro)	-3,9	-1,6



n	DHBV	PreS2-TLM	DHBV	PreS2-TLM
42	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
43	I (Ile)	L (Leu)	4,5	3,8
44	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
45	H (His)	S (Ser)	-3,2	-0,8
46	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
47	L (Leu)	F (Phe)	3,8	2,8
48	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
49	H (His)	R (Arg)	-3,2	-4,5
50	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
51	Q (Gln)	G (Gly)	-3,5	-0,4
52	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
53	M (Met)	P (Pro)	1,9	-1,6



n	HHBV	PreS2-TLM	HHBV	PreS2-TLM
45	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
46	I (Ile)	L (Leu)	4,5	3,8
47	Q (Gln)	S (Ser)	-3,5	-0,8
48	H (His)	S (Ser)	-3,2	-0,8
49	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
50	M (Met)	F (Phe)	1,9	2,8
51	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
52	H (His)	R (Arg)	-3,2	-4,5
53	I (Ile)	I (Ile)	4,5	4,5
54	D (Asp)	G (Gly)	-3,5	-0,4
55	S (Ser)	D (Asp)	-0,8	-3,5
56	V (Val)	P (Pro)	4,2	-1,6



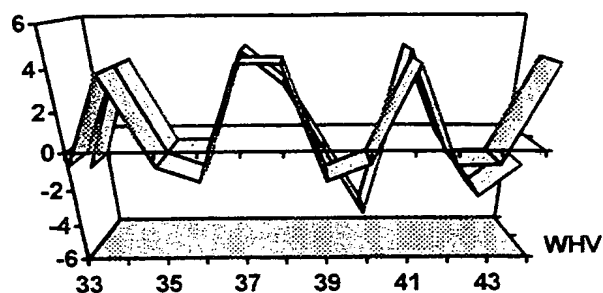
Amphiphile Motive in der PreS-Region verschiedener avianer Hepadnaviren

Vergleich der Hydrophathie-Profile des PreS2-TLM (grün) mit Ausschnitten der PreS-Region von DHBV3 (rot) und HHBV (blau). In den Tabellen sind die Positionen der Aminosäuren in DHBV3 bzw. HHBV angegeben (n), zusammen mit der Aminosäuresequenz des entsprechenden Abschnittes und des PreS2-TLM. Zusätzlich sind die Hydrophathie-Werte angegeben (nach Kyte & Doolittle, 1982). Zwischen den Aminosäuren 20 bis 31 und 42 bis 53 von DHBV3 bzw. 45 bis 56 von HHBV befinden sich Motive ähnlicher Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren wie im PreS2-TLM.

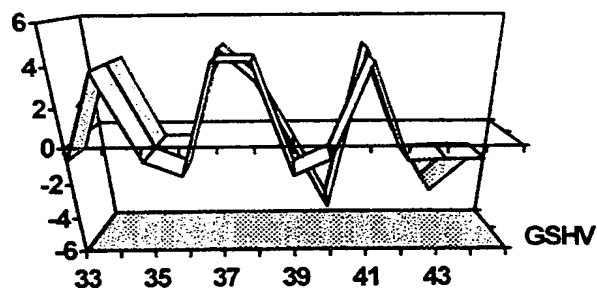
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 5

n	WHV	PreS2-TLM	WHV	PreS2-TLM
33	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
34	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
35	S (Ser)	S (Ser)	-0,8	-0,8
36	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
37	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
38	V (Val)	F (Phe)	4,2	2,8
39	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
40	T (Thr)	R (Arg)	-0,7	-4,5
41	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
42	S (Ser)	G (Gly)	-0,8	-0,4
43	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
44	I (Ile)	P (Pro)	4,2	-1,6



n	GSHV	PreS2-TLM	GSHV	PreS2-TLM
33	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
34	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
35	S (Ser)	S (Ser)	-0,8	-0,8
36	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
37	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
38	V (Val)	F (Phe)	4,2	2,8
39	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
40	T (Thr)	R (Arg)	-0,7	-4,5
41	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
42	S (Ser)	G (Gly)	-0,8	-0,4
43	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
44	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6

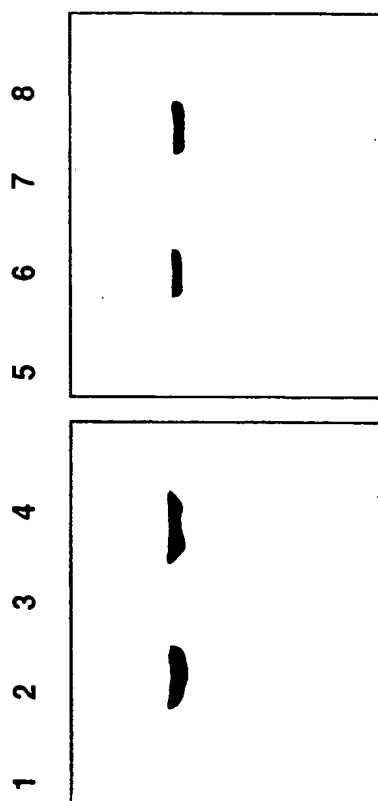


Amphiphile Motive in der PreS2-Region verschiedener Hepadnaviren der Nagetiere
 Vergleich der Hydrophathie-Profile des PreS2-TLM (grün) mit Ausschnitten der PreS-Region von WHV (türkis) und GSHV (gelb). In den Tabellen sind die Positionen der Aminosäuren in WHV bzw. GSHV angegeben (n), zusammen mit der Aminosäuresequenz des entsprechenden Abschnittes und des PreS2-TLM. Zusätzlich sind die Hydrophathie-Werte angegeben (nach Kyte & Doolittle, 1982). Zwischen den Aminosäuren 33 bis 44 von PreS2 aus WHV und GSHV befinden sich Motive ähnlicher Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren wie im PreS2-TLM. Das Motiv ist zwischen den beiden Hepadnaviren konserviert.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/6

Fig. 6

**DHBV42-53-EGFP ist ein zellpermeables Protein**

Immunoblot zytosolischer Lysate von 293-Zellen nach 10-minütiger (1, 2, 5, 6) bzw. 20-minütiger Inkubation (3, 4, 7, 8) mit 1 mM EGFP (1, 3, 5, 7) oder 1 mM DHBV42-53-EGFP (2, 4, 6, 8). Zur Ausführung des Immunoblottes wurden ein gegen den N-terminalen Hexa-His-Tag der rekombinanten Proteine (1-4) bzw. ein gegen EGFP gerichteter Antikörper verwendet (5-8).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/36, C07K 14/02, C12N 15/62, C07K 19/00, 16/08, C12N 15/87	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/26379 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 2000 (11.05.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03506 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1999 (03.11.99) (30) Prioritätsdaten: 198 50 718.6 3. November 1998 (03.11.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HILDT, Eberhard [DE/DE]; Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, Ismaninger Strasse 22, D-81675 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMIDT, Stephanie [DE/DE]; Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, Ismaninger Strasse 22, D-81675 München (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 5. Oktober 2000 (05.10.00)	
(54) Title: POLYPEPTIDE MEDIATING CELL PERMEABILITY (54) Bezeichnung: ZELLPERMEABILITÄT-VERMITTELNDES POLYPEPTID (57) Abstract The present invention relates to a cell-permeable polypeptide that can mediate cell permeability to substances, DNA coding for said polypeptide and a method for the production of said polypeptide. The invention also relates to antibodies directed against said polypeptide and the use of said polypeptide in the mediation of cell permeability to substances. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid, das zellpermeabel ist und Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, eine für ein solches Polypeptid kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sowie die Verwendung des Polypeptids zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/03506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/36 C07K14/02 C12N15/62 C07K19/00 C07K16/08
C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HILDT E. ET AL.: "Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator"</p> <p>ONCOGENE, vol. 11, no. 10, 16 November 1995 (1995-11-16), pages 2055-2066, XP000922823 page 2059, left-hand column; figure 4 page 2061, right-hand column; figure 7 page 2063, right-hand column, paragraph 2 -page 2065, left-hand column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	2-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 2000

Date of mailing of the international search report

20/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/03506

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 20657 A (GX BIOSYSTEMS A/S (DK); SOKURENKO; HASTY; KLEMM; PALLESEN; MOLIN) 3 August 1995 (1995-08-03) abstract page 57 page 62 -page 66 figure 8	1-9
X	EP 0 456 215 A (ABBOTT LABORATORIES (US); MIMMS L.T.; FLOREANI M.F.) 13 November 1991 (1991-11-13) abstract page 22; claim 1	1,2,9
X	WIEPRECHT T. ET AL.: "Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides" BIOCHEMISTRY, vol. 36, 1997, pages 12869-12880, XP002141072 abstract page 12873, right-hand column, paragraph 2 -page 12874, left-hand column, paragraph 3; table 1	1,10,11
T	OESS S. UND HILDT E. : "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens" GENE THERAPY, vol. 7, no. 9, May 2000 (2000-05), pages 750-758, XP000922825	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520657 A	03-08-1995	AU 1532795 A	15-08-1995
		CA 2180726 A	03-08-1995
		EP 0738325 A	23-10-1996
EP 0456215 A	13-11-1991	AU 646039 B	03-02-1994
		AU 7648191 A	14-11-1991
		CA 2041772 A	12-11-1991
		JP 4228087 A	18-08-1992

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. .ationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03506

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/36 C07K14/02 C12N15/62 C07K19/00 C07K16/08
C12N15/87

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HILDT E. ET AL.: "Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator" ONCOGENE, Bd. 11, Nr. 10, 16. November 1995 (1995-11-16), Seiten 2055-2066, XP000922823 Seite 2059, linke Spalte; Abbildung 4 Seite 2061, rechte Spalte; Abbildung 7 Seite 2063, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 2065, linke Spalte, Absatz 1 --- -/--	2-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Macchia, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 20657 A (GX BIOSYSTEMS A/S (DK); SOKURENKO; HASTY; KLEMM; PALLESEN; MOLIN) 3. August 1995 (1995-08-03) Zusammenfassung Seite 57 Seite 62 -Seite 66 Abbildung 8 ----	1-9
X	EP 0 456 215 A (ABBOTT LABORATORIES (US); MIMMS L.T.; FLOREANI M.F.) 13. November 1991 (1991-11-13) Zusammenfassung Seite 22; Anspruch 1 ----	1,2,9
X	WIEPRECHT T. ET AL.: "Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides" BIOCHEMISTRY, Bd. 36, 1997, Seiten 12869-12880, XP002141072 Zusammenfassung Seite 12873, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 12874, linke Spalte, Absatz 3; Tabelle 1 ----	1,10,11
T	OESS S. UND HILDT E. : "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens" GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 9, Mai 2000 (2000-05), Seiten 750-758, XP000922825 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03506

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9520657 A	03-08-1995	AU 1532795 A	15-08-1995
		CA 2180726 A	03-08-1995
		EP 0738325 A	23-10-1996
EP 0456215 A	13-11-1991	AU 646039 B	03-02-1994
		AU 7648191 A	14-11-1991
		CA 2041772 A	12-11-1991
		JP 4228087 A	18-08-1992

THIS PAGE BLANK (USPTO)